Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. A. Hahn.

Der Abbau der Milchsäure im Muskelbrei.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Friedrich Bahner
aus Oberlungwitz i. Sa.

Druck von Georg Mugler, Oberlungwitz i. Sa.

1930

Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. A. Hahn.

Der Abbau der Milchsäure im Muskelbrei.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Friedrich Bahner
aus Oberlungwitz i. Sa.

Druck von Georg Mugler, Oberlungwitz i. Sa.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent: Prof. Dr. A. Hahn

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1938.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gegenüber dem besonders von Meyerhof studierten Milchsäureschwund des intakten, überlebenden Muskels bei Gegenwart von Sauerstoff zeigt der Milchsäureschwund in der zerkleinerten Muskulatur von Warm- und Kaltblütern von Grund aus Unterschiede. Während dort mit dem Milchsäureschwund eine Resynthese von Kohlehydrat einhergeht, ist bei zerkleinerter Muskulatur diese nicht vorhanden. Die Resynthese im ersten Falle ist an die intakte Muskelstruktur gebunden, was schon von Fletcher und Hopkins (19) behauptet worden war und von Hahn, Belmonte und Niemer (20) bewiesen wurde. Diese Autoren verfolgten die Resynthese des Glykogens in Sauerstoff in intakten Froschmuskeln, verglichen mit der Resynthese in den zerschnittenen Muskeln. Einmaliges Längszerschneiden war ohne Einfluß auf die Resynthese, einmaliges Querzerschneiden setzt sie bereits auf $^1/_2$ herab. Bei vollständiger Zerkleinerung bleibt der Glykogenwert in Sauerstoff praktisch konstant (18). Die Resynthese ist also für uns heute noch ein vollständig ungeklärter Vorgang, da er an die intakte Muskelstruktur gebunden ist. Somit läßt sich über den Milchsäureschwund des intakten Muskels bei Sauerstoffgegenwart nichts aussagen, als daß er eben existiert. Auf Grund von — den Bestimmungen der verschwindenden Milchsäure parallel laufenden — Bestimmungen des dabei auftretenden Sauerstoffverbrauches hatte Meyerhof (28) den Schluß gezogen, daß $^3/_4$ der Milchsäure in Glykogen rückverwandelt werden auf Kosten von $^1/_4$, das vollständig oxydiert wird. Er faßte das als eine gekoppelte Reaktion auf, was von Hahn abgelehnt wurde (19). Später sprach Meyerhof (29) von der Oxydation von $^1/_4$ Milchsäureäquivalenten, sei es nun Milchsäure oder Kohlehydrat. Damit war das Wesen der Resynthese als gekoppelte Reaktion aufgegeben. Die Pasteur'sche Reaktion, das ist die Hemmung der Glykolyse durch Sauerstoff, war von Pasteur selbst so aufgefaßt worden, daß in lebenden Zellen die Gärung für die Atmung vikariierend eintreten kann (32). Über einen kausalen Zusammenhang beider Reaktionen war damit nichts ausgesagt. Meyerhof versuchte diesen zu geben, indem er die gekoppelte Reaktion beschrieb, die auch eintreten sollte, wenn bei Reizung des Muskels schon Sauerstoff zugegen ist. In diesem Falle sollte $^1/_4$ oxydiertes Milchsäureäquivalent die restlichen $^3/_4$ am Entstehen verhindern. Es wurde schon oben gesagt, daß eine gekoppelte

Reaktion nicht besteht und daß somit der Kausalzusammenhang zwischen Atmung und Gärung des Muskels noch nicht gefunden war. Lipmann glaubt ihn gefunden zu haben, indem er dem glykolytischen Fermentsystem eine durch Sauerstoff zu hemmende Eigenschaft zuwies. Er hat gefunden, daß der hemmende Einfluß des Sauerstoffs durch positive Oxydoreduktionssysteme der Indophenolreihe ersetzbar ist (25).

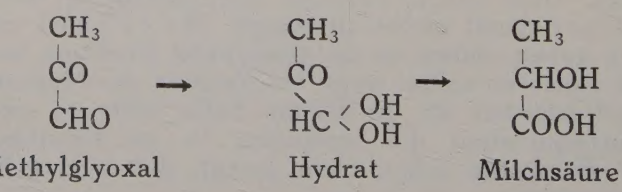
Produktiver für die Frage der Stoffwechselvorgänge im Muskel, besonders in Hinsicht auf die fermentativen Vorgänge und die Zwischenglieder der Glykolyse waren die Versuche mit Muskelbrei. Bei ihm fallen die komplizierenden Vorgänge der Resynthese weg. Die hier auftretende Pasteur'sche Reaktion ist also ganz anderer Art als im intakten Muskel. Sie ist aber auch hier vorhanden, denn ein mit Sauerstoff digerierter Muskelbrei zeigt keine Bildung von Milchsäure, wohingegen ein im Vakuum digerierter Muskelbrei stark glykolysiert. Diese Hemmung besteht nach Lipmann (25) in dem — allerdings noch nicht bewiesenen — oben beschriebenen Vorgang.

Die zahlreichen Stoffe, die als Zwischenglieder der Glykolyse auftreten, fügen sich in ihrem Chemismus der Wieland'schen Dehydrierungstheorie vollkommen ein. Zahlreiche Dehydrasen spielen dabei eine Rolle. Die Vorstufe der Milchsäure ist dabei die Brenztraubensäure, die nach Hahn, Fischbach und Haarmann (16) in allen Zellen vorkommt und durch eine Oxydoreduktion in jene verwandelt wird. Ihr chemischer Partner ist dabei die Glyzerinsäurephosphorsäure, die dabei gleichzeitig in Glyzerinaldehydphosphorsäure übergeht (5):

Glycerinsäurephosphorsäure + Brenztraubensäure →
Glycerinaldehydphosphorsäure + Milchsäure.

Utewski (34) stellte ebenfalls die Umwandlung von Brenztraubensäure in Milchsäure im Muskelbrei fest, indem er Brenztraubensäure zusetzte und 50 % der zugesetzten Menge als Milchsäure wiederfand.

Das nach Dakin und Dudley (2) und nach Neuberg (31) als Zwischenprodukt der Glykolyse auftretende Methylglyoxal, das nach Wieland (35) durch innere Dismutation direkt in Milchsäure übergeht,



Methylglyoxal Hydrat Milchsäure

gibt nach Embden (6) bei Zusatz zum Muskel nur die unphysiologische l-Milchsäure, ist also nicht als Zwischenglied der Glykolyse anzusehen.

Im allgemeinen kann auch Alanin zu Milchsäure desamidiert werden (30), was aber für den spezifischen Muskelstoffwechsel ohne Bedeutung sein muß.

Es scheint also alle Milchsäure im Muskel die Brenztraubensäure als Vorstufe zu haben.

Milchsäureschwund unter anaeroben Bedingungen.

Der aerobe Milchsäureschwund im intakten Muskel war schon Fletcher und Hopkins (9) bekannt, im Muskelbrei ist er noch nicht solange beobachtet. Unter anaeroben Bedingungen konnte er nun im Muskelbrei zunächst nicht erkannt werden, da solcher Brei eine starke Glykolyse hat und die neu entstehende Milchsäure den Schwund total überlagert und überholt. Als es gelang die Glykolyse durch Gifte zu hemmen, wurde nun ein Milchsäureschwund ohne Gegenwart von Sauerstoff von Embden u. a. (8,3,4) im natriumfluoridvergifteten Muskel festgestellt und von Haarmann (13) im halogenessigsäurevergifteten Muskel. Nachstehend ein Beispiel von Lehnartz (7):

sofort	2 Std.	5 Std.	10 Std.	1m-NaF-Lösung mit 2% Bikarbonat
0,244	0,201	0,193	0,186	

Milchsäuremengen in %.

Man sieht ein anaerobes Absinken von 0,244 % auf 0,186 % in 10 Stunden, also um ca. 23 % der ursprünglich vorhandenen Milchsäuremenge.

Die Versuche von Embden (8,3,4) mit Natriumfluorid wurden von Lipmann (23) angezweifelt, da das Natriumfluorid die Milchsäurebestimmung stark beeinflussen sollte.

Haarmann fand bei Monobromessigsäurezusatz einen Schwund von 25—30 % der vorhandenen Milchsäure.

Hahn, Fischbach und Haarmann (16) gelang es dann, den anaeroben Milchsäureschwund sicherzustellen durch Abfangen des ersten Abbauproduktes, der Brenztraubensäure, in die jene durch Dehydrierung übergeht.

Der Übergang Milchsäure — Brenztraubensäure ist also reversibel und da der Vorgang eine einfache Dehydrierung ist, hat man ein Oxydoreduktionssystem vor sich, dessen Komponenten ein Gleichgewicht einstellen, das abhängig ist:

1.) von den Mengen der Komponenten,
2.) von den außerdem anwesenden Wasserstoffacceptoren und -donatoren respektive von deren Redoxpotentialen.

Das Redoxpotential des Systems Milchsäure-Brenztraubensäure wurde von Banga, Laki und Szent-Györgyi (1) zu $E_0 = -181$ mV bestimmt und von Wurmser (36) ebenfalls festgestellt.

Nun finden sich bereits im frischen Muskelbrei natürliche Wasserstoffacceptoren (Hahn 16), die im Verein mit einer Milchsäuredehydrase die Dehydrierung der Milchsäure bewirken. Setzt man aber einen starken Wasserstoffacceptor, wie Methylenblau zu, so wird das Gleichgewicht so verschoben, daß man eine bedeutend größere Brenztraubensäureausbeute hat. Nachstehend einige Versuche von Hahn (15):

ohne		mit Methylenblau	
ohne Lact.	mit	ohne Lact.	mit
249	427	678	745
229	381	484	673

mg Phenylhydrazon der Brenztraubensäure.

Man sieht, daß mit Methylenblauzusatz die Ausbeute an Brenztraubensäure besonders nach Lactatzusatz stark ansteigt, daß sie aber auch schon ohne Methylenblau in starkem Maße erfolgt. Es werden etwa 25 % des zugesetzten Lactats als Brenztraubensäure wiedergefunden, mit Methylenblau etwa doppelt soviel.

Die Ergebnisse von Hahn beweisen den anaeroben Milchsäureabbau und seine Abhängigkeit von natürlichen Acceptoren, die in wechselnder Menge im Muskel vorhanden sein können, da sie selbst zum Teil Zwischenprodukte der Glykolyse sind.

Aerober Milchsäureschwund.

Die Erkenntnis des Redoxpotentials des Milchsäure-Brenztraubensäuresystems muß natürlich auch für die Gegenwart von Sauerstoff gelten. Falls das Experiment ergibt, daß Milchsäure aerob verschwinden kann, muß man annehmen, daß der Sauerstoff direkt oder auf dem Umwege über andere reversible Redoxsysteme an der Dehydrierung der Milchsäure teilnimmt.

Der aerobe Milchsäureschwund des intakten Muskels war in den klassischen Arbeiten von Fletcher und Hopkins beschrieben worden (9). Im Muskelbrei wurde er von Meyerhof behauptet, als dieser die Atemsteigerung durch Lactatzusatz nachwies (27). Im natriumfluoridvergifteten, glykolysegehemmten Muskel wurde sie von Lipmann (24) ebenfalls gefunden, wobei dieser Autor gleichzeitig den Milchsäureschwund an Hand von Milchsäurebestimmungen selbst fand. Nachstehend einen Tabellenauszug von Lipmann (24):

	I	II	
Anfangswert der Milchsäure	0,60	1,07	NaF Konz. 0,01 mol.
Endwert in N_2	0,59	1,10	Milchsäure in mg
Endwert in O_2	0,35	0,84	pro g Muskel.
Oxydationsquotient	1,2	1,04	

Man sieht die Hemmung der Glykolyse durch das Natriumfluorid, den Schwund der Milchsäure in Sauerstoff und den Oxydationsquotienten von 1, der besagt, daß die Milchsäure vollständig zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wurde.

Man fragt sich, warum dieser Milchsäureschwund nicht früher schon beobachtet worden war. Der Grund liegt in der nicht absolut sicheren Hemmung der Glykolyse durch Sauerstoff, die die Milchsäurebilanz hier verschleiert, vor allem aber auch daran, daß der Muskel garnicht angewiesen ist, Milchsäure zu veratmen, da er ja genügend Kohlehydrate zur Verfügung hat, deren Abbau ihm erst bei Hemmung der Glykolyse unmöglich ist, eine Andeutung, daß auch der normale oxydative Kohlehydratabbau, auch in der Ruhe, über Milchsäure zu gehen scheint, die aber hier nicht als Zwischenprodukt stabil ist.

Um den aeroben Milchsäureabbau im Muskelbrei doch im nichtvergifteten Muskel zu beobachten, wurden auf Anregung von Herrn Prof. Hahn die folgenden Versuche ausgeführt:

Das Prinzip der Versuche war die Herabsetzung des Glykogenvorrates im Rattenmuskel durch Hungernlassen der Tiere, unterstützt durch einen Phlorizindiabetes. Durch feinstes Zerschneiden der Muskeln wird dann das noch vorhandene Glykogen glykolysiert (Fletcher und Hopkins, 10), wodurch die für den Versuch notwendige Milchsäure entsteht und 2. der Glykogenvorrat so tief gesenkt wird, daß die Glykolyse aus Mangel an Material ausbleibt, was bei einem gewissen Glykogenminimum eintritt (Hahn, 17). Dies wird kontrolliert an einer Milchsäurebestimmung nach der Zerschneidung und an einer Milchsäurebestimmung nach Digestion im Vakuum. In einer 3. Bestimmung wird mit Sauerstoff digeriert und untersucht, ob ein Milchsäureschwund eintritt.

Methodik.

Die als Versuchstiere dienenden ausgewachsenen Ratten wurden in Glasgefäßen, die nur einen Napf mit Wasser enthielten, untergebracht. Vom ersten Hungertage an wurde zur Erreichung einer schnellen und ausgiebigen Glykogenverarmung Phlorizin injiziert. Von diesem Glucosid wurden 150 mg in 1,0 ccm Olivenöl verrieben und gelöst und hiervon 0,2 bis 0,3 ccm subcutan injiziert. Nach einer solchen Injektion trat sofort starke Glykosurie auf, die längere Zeit anhielt. Diese Depotbehandlung wurde täglich wiederholt, sodaß die Tiere bald matt wurden und nach 4—7 Tagen dem Tode so nahe waren, daß sie getötet wurden. Sofort wurde die Muskulatur der Extremitäten abpräpariert, Sehnen und sichtbare Fascien entfernt, wobei man 20 — 25 g Muskel erhält. Diese wurden mit der Schere feinst zerkleinert, was besonders sorgfältig und ausgiebig geschehen muß. Der in der Muskulatur noch vorhandene Rest von Glykogen verschwindet durch die Zerkleinerung. Mit je 5 g des Muskelbreies wurden die Ansätze gemacht.

Die Versuche wurden in Reagenzröhren 285×35 mm angestellt, die mit dichtsitzenden, durchbohrten Gummistopfen fest verschlossen werden können. In der Bohrung steckt ein Glasrohr, auf das ein durch eine Klemme dicht abzuschließendes Gummirohr aufgepaßt ist.

Zusammensetzung der Ansätze:

5 g Muskelbrei
10,0 ccm Phosphatpuffer
10,0 ccm destilliertes Wasser.

Den Puffer von pH = 7 stellt man durch Lösen von 3,6 g Kaliumphosphat kH_2PO_4 und von 7,2 g Natriumphosphat Na^2HPO^4 im Liter Wasser her.

Die Muskulatur jeder Ratte wird in 3 solchen Ansätzen untersucht. Der erste Versuch dient zur Feststellung des Milchsäuregehaltes bei Versuchsbeginn. Der 2. und 3. werden an einer gutziehenden Wasserstrahlpumpe evakuiert bis das Manometer konstanten Druck anzeigt und dann noch kurze Zeit an der Pumpe gelassen, um noch in der Flüssigkeit enthaltene Gasreste zu entfernen. Einer von beiden wird nun noch mit Sauerstoff, den man einem Gasometer entnimmt, gefüllt, wobei die Röhre zur Sättigung der Flüssigkeit mit Sauerstoff gut durchgeschüttelt wird.

Das evakuierte und das mit Sauerstoff gefüllte Rohr werden nun in einem Thermostaten von 37 ° auf eine Schüttelvorrich-

tung gebracht, wo sie andauernd und langsam geschüttelt werden. Nach 2—3 Stunden wird der Versuch unterbrochen. Nach Einbringen des 2. und 3. Versuchs in den Thermostaten enteiweißt man den 1. Versuch mit Sublimat-Salzsäure, indem man 20 ccm 4%ige Salzsäure und 40 ccm gesättigte Sublimatlösung in die Röhre gibt. Die beiden im Thermostaten verweilenden Versuche unterbricht man auf dieselbe Weise durch Enteiweißung und läßt dann alle 3 Röhren im Eisschrank über Nacht stehen, wonach die Enteiweißung vollständig ist.

Der Inhalt jeder Röhre wird durch ein Faltenfilter dann in einen 400 ccm Meßkolben filtriert, mit stark verdünnter Sublimatlösung nachgespült, um die dem Meßkolben anhaftende Milchsäure abzuspülen. In dem Meßkolben wird gegen Phenolphtalein mit 30%iger Natronlauge neutralisiert und nun die Entfernung der Kohlehydrate durch Kupfer-Kalk-Fällung nach Clausen vorgenommen. Hierzu braucht man eine 10%ige Kupfersulfatlösung und eine Aufschwemmung von 100 g Calciumoxyd im Liter Wasser. Nach der Neutralisation des Filtrates der Enteiweißung im Meßkolben, bei der eine gelbe Fällung von Quecksilberoxyd entsteht, die aber unbeachtet gelassen wird, setzt man 20 ccm der Kupfersulfatlösung und 40 ccm der Kalkaufschwemmung zu, füllt bis zur Marke mit Wasser auf und schüttelt gut um. Nach einer halben Stunde wird durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Vom Filtrat verwendet man 300 ccm zur jetzt erfolgenden Milchsäurebestimmung, die nach Friedemann, Cotonio und Shaffer (11) in etwas modifizierter Weise von Hahn (21) vorgenommen wird.

Das Prinzip dieser Methode ist die Oxydation der Milchsäure mittels Kaliumpermanganat zu Azetaldehyd, der in Natrium-Bisulfitlösung aufgefangen wird. Nach Titration des überschüssigen Bisulfits mit Jodlösung und Stärke als Indikator bis zum Umschlag wird Natriumbikarbonat messerspitzenweise zugegeben, wodurch die Absorptionsverbindung des Azetaldehyds gespalten wird und das nun freiwerdende Bisulfit die Lösung wieder entfärbt. Nun wird wieder bis zum Umschlag titriert, bis auf Zusatz von Natriumbikarbonat dieser nicht wieder verschwindet.

Man füllt die 300 ccm der zu untersuchenden Lösung in den 1 Liter fassenden Kjeldahlkolben. Mit verdünnter Schwefelsäure wird mit dem noch von der Neutralisation nach der Enteiweißung vorhandenen Phenolphtalein, das die alkalische Lösung der Kupfer-Kalk-Fällung rötlich gefärbt hat, neutralisiert und mit 10 ccm einer Lösung von 100 g Manganosulfat in 100 ccm Wasser mit Zusatz von 18 ccm konz. Schwefelsäure

schwach angesäuert. Das Mangansalz wirkt bei der Oxydation mit Permanganat als Katalysator, der Säurezusatz stellt das für die Reaktion erforderliche Milieu her. Nach Zusatz von etwas Talkum (gegen das Stoßen der Flüssigkeit) wird der Kjeldahlkolben an das untere Ende eines Dimrothkühlers angeschlossen und mit der Flamme zum Sieden erhitzt. In den Kolben führt durch eine Bohrung außerdem ein Zulaufrohr, in das aus einem Scheidetrichter eine 0,005 n-Permanganatlösung, die im Liter 1,5 ccm konz. Schwefelsäure enthält, eintropfen kann. Das obere Ende des Kühlers ist durch ein Glasrohr mit einem als Absorptionsgefäß dienenden Zylinder verbunden, der mit einer 0,4%igen Kaliummetabisulfitlösung gefüllt ist und durch den von oben her ein Luftstrom mit einer Wasserstrahlpumpe durchgesaugt wird, der durch das Zulaufrohr für die Permanganatlösung in die Apparatur eintritt. Erst wenn die Flüssigkeit im Kolben siedet, läßt man tropfenweise Permanganat zufließen und läßt nun solange laufen, bis es im Kolben nicht mehr entfärbt wird und der Kolbeninhalt sich rosa färbt. Dann wird unterbrochen, die Bisulfitlösung quantitativ in einen Erlenmeyerkolben übergeführt und unter Zusatz einer Messerspitze löslicher Stärke mit 0,1 n-Jodlösung bis kurz vor den Umschlag titriert, der dann mit einer 0,01 n-Jodlösung genau eingestellt wird. Jetzt gibt man in der schon oben beschriebenen Weise Natriumbikarbonat zu und titriert wieder bis zum Umschlag. Die bei der 2. Titration verbrauchte Anzahl ccm 0,01 n-Jodlösung gibt, mit 0,45 multipliziert, den Milchsäuregehalt der Lösung, der aber außerdem mit 4/3 zu multiplizieren ist, da nur 300 ccm von 400 ccm ursprünglich aus dem Versuch erhaltener Flüssigkeit zur Bestimmung kommen.

Es folgt die Aufstellung der Versuchsergebnisse:

Nr.	Direkt	Vacuum	O_2	Zunahme im Vac.	Abnahme in O_2	
1	29,7	39,9	32,1	+10,2	+ 2,4	normale Ratte
2	26,2	28,3	23,6	+ 2,1	— 2,6	Durchschnitt der Abnahme in O_2 1,5 mg.
3	13,5	13,8	12,9	+ 0,3	— 0,6	
4	14,5	18,0	13,0	+ 3,5	— 1,5	
5	17,0	17,0	15,7	± 0	— 1,3	
6	34,4	35,7	31,1	+ 0,8	— 3,8	mit Zusatz von 20 mg Lactat Durchschnitt der Abnahme in O_2 2,9 mg
7	33,0	32,8	29,9	— 0,2	— 3,1	
8	31,6	31,7	29,5	+ 0,1	— 2,1	
9	36,9	37,0	34,2	+ 0,1	— 2,7	
10	36,6	36,8	31,8	± 0	— 4,8	

in mg Milchsäure pro 5 g Muskel.

Die Fehlergrenze der gesamten Bestimmung einschließlich Digestion ist 0,5 mg Milchsäure.

Nr. 1 ist der Versuch mit der Muskultur einer Ratte, die nicht gehungert hat und kein Phlorizin bekam. Man sieht, daß der zu Beginn des Versuchs vorhandene Milchsäurewert relativ hoch ist, was durch die sehr feine Zerschneidung der Muskulatur zu Beginn des Versuchs erklärt wird. Trotzdem hat bei der Digestion im Vacuum noch eine reichliche Milchsäurezunahme stattgefunden, ein Zeichen, daß in der Muskulatur noch genügend Glykogen vorhanden ist. Im Parallelversuch mit Sauerstoff erkennt man die Hemmung der Glykolyse, die allerdings nicht vollständig ist. Dieser Versuch zeigt also eine normale Pasteur'sche Reaktion.

Bei den Hungerratten ist von einer normalen Pasteur'schen Reaktion nichts mehr zu erkennen. Die Milchsäuremengen, die zu Beginn des Versuchs vorhanden sind, haben während der Digestion im Vacuum nur minimal zugenommen, in Versuch Nr. 5 und 10 sind sie konstant geblieben, in Versuch Nr. 7 nahm der Wert, allerdings innerhalb der Fehlergrenze, ab. Die Glykolyse war also nur noch sehr schwach und das überhaupt noch im Muskel vorhandene Glykogen wurde sofort bei der Zerschneidung des Muskels in Milchsäure verwandelt. Daß diese Methode der Ausschaltung der Glykolyse also erfolgreich war, sieht man an dieser geringfügigen Glykolyse bei Digestion im Vacuum. Die Milchsäurewerte der Versuche Nr. 2 bis 10 der Digestionen in Sauerstoff liegen nun bemerkenswerterweise alle unter den Werten zu Beginn der Versuche. Der Versuch 2 liegt zwar an der Fehlergrenze, die anderen Werte sind aber alle einwandfrei außerhalb derselben. Ein Teil der Milchsäure, die zu Beginn in der Muskulatur vorhanden war, ist also oxydativ geschwunden.

In den Versuchen Nr. 6 bis 10 war zur Verdeutlichung des aeroben Milchsäureschwundes zu jedem Ansatz 20 mg Lithiumlactat zugegeben worden, indem an Stelle von 10,0 ccm Wasser 10,0 ccm einer Lithiumlactatlösung von 1 g in 500 ccm Wasser zugegeben worden war. Die Milchsäurewerte dieser Versuche liegen also 20 mg über dem eigentlich zu Versuchsbeginn vorhandenen Wert. Der Effekt des aeroben Milchsäureschwundes ist hier deutlich stärker als in den Versuchen Nr. 2 bis 5 ohne Lactatzusatz.

Es taucht die Frage auf, ob das Fermentsystem der Hungerratte überhaupt noch in Ordnung ist. Einmal ist das anzunehmen, da die Ratten trotz ihrer Mattigkeit am Ende des Hungerns aller Bewegungen noch fähig waren, die Tätigkeit der Muskulatur also nicht gestört war. Dem Phlorizin kann auch kein Einfluß auf das Fermentsystem zugeschrieben werden, da seine Angriffspunkte die Leber, indem in dieser eine Glykogenverarmung eintritt (12) und die Niere sind, indem hier ein renaler

Diabetes gesetzt wird (26). Auch Lichtwitz (22) äußert sich, daß keine Schädigung auf das Fermentsystem der Muskulatur anzunehmen ist. Die Tätigkeit der Dyhydrasen im Rattenmuskel wurde zudem in einem Mikroversuch nach Thunberg (33) mit Methylenblau als Acceptor geprüft. Bei einem Ansatz von

0,5 g Muskel
0,8 ccm Lithiumlactat 1%, resp. 0,8 ccm Wasser
0,4 ccm Methylenblaupuffer

wurde in 7 Minuten mit und ohne Lactat entfärbt.

Der Methylenblaupuffer ist der schon oben beschriebene Phosphatpuffer von pH = 7,0 mit einem Zusatz von 0,1% Methylenblau. Die Entfärbungszeit ist dieselbe wie die von Muskulatur normaler Tiere, was die Intaktheit der Dehydrasen beweist.

Für die Tatsache des aeroben Milchsäureschwundes der obigen Versuche gibt es 2 Erklärungsmöglichkeiten der stattgehabten Oxydation: 1. Abbau der Milchsäure bis zu Kohlensäure und Wasser; 2. Dehydrierung zu Brenztraubensäure. Die 2. Möglichkeit wäre so zu denken, daß der Sauerstoff irgendeinen Wasserstoffdonator dehydriert und dieser nun seinerseits als Acceptor die Milchsäure dehydriert. Dieses zwischen Milchsäure und Sauerstoff eingeschaltete Redoxsystem müßte man annehmen, da sonst auch schon im Versuch ohne Sauerstoff die Dehydrierung hätte eintreten müssen. Denkbar wäre hier aber auch die direkte Dehydrierung der Milchsäure mit Sauerstoff als Acceptor.

Vergleicht man beide Möglichkeiten in Hinsicht auf den für die Oxydation nötigen Sauerstoffverbrauch, so errechnen sich für $C_3H_6O_3 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O$ für eine Molekel Milchsäure 6 Atome Sauerstoff, bei $C_3H_6O_3 \rightarrow C_3H_4O_3 + H_2O$ nur ein Atom Sauerstoff.

Eine Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs muß also zwischen beiden Möglichkeiten entscheiden.

Zur Lösung der Frage wurden Atemversuche nach Warburg mit Barcroft-Manometern angestellt. Die Ansätze waren:

I.	II.
0,1 g Muskel	0,1 g Muskel
0,5 ccm Phosphatpuffer (s. o.)	0,5 ccm Lithiumlactatlösung, 1 g in 500 ccm Wasser
0,5 ccm Wasser	0,5 ccm Phosphatpuffer

Benützt wurde die Muskulatur, die im Versuch Nr. 10 gleichzeitig auf den Milchsäureschwund hin untersucht wurde. Diese Muskulatur war besonders günstig, da im Vacuum keine Milch-

säurenachbildung stattfand. Die Temperatur war 25°, die Dauer 1½ Stunde.

Resultat: I: 41,3 cmm Sauerstoff
II: 62,8 cmm Sauerstoff.

Man erkennt zunächst im Unterschied des Sauerstoffverbrauchs des Versuchs mit und des Versuchs ohne Lactat die beträchtliche Steigerung der Atmung durch Lactat, die oben (S. 7) schon erwähnt worden war.

Vergleicht man nun den dem Versuch Nr. 10 vergleichbaren Versuch II (beide mit Lactatzusatz), so errechnet sich unter der Annahme, daß eine Molekel Milchsäure vollständig zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wird, eine dem Sauerstoffverbrauch von 62,8 cmm für 100 mg Muskel entsprechende Milchsäuremenge von 4,2 mg pro 5 g Muskel. Zieht man die etwas kürzere Digestionszeit des Atemversuchs in Betracht, so ist das eine Menge, die mit der in Versuch Nr. 10 geschwundenen Milchsäure von 4,8 mg gut übereinstimmt. Die Möglichkeit einer bloßen Dehydrierung zu Brenztraubensäure mit Sauerstoff als Acceptor ist also ausgeschlossen, denn dann hätte mit derselben Sauerstoffmenge 6 mal soviel Milchsäure, also 25,2 mg, verschwinden müssen. Auch die Annahme einer Oxydation bis zu einem Zwischenprodukt zwischen Brenztraubensäure und Kohlensäure ist nicht möglich, da eben der respiratorische Quotient

$$\frac{\text{Milchsäureschwund}}{\text{vollst. oxyd. Milchsäureäquivalente}} = 1.$$

Die Versuche von Lipmann (24) können also bestätigt werden.

Sicher ist aber anzunehmen, daß die zu Kohlensäure und Wasser führende Oxydation der Milchsäure über Brenztraubensäure geht (s. o. S. 6), aber eben bei dieser Stufe nicht haltmacht.

Aus den Sauerstoffzahlen der Atemversuche wird auch klar, warum bei der Digestion in Sauerstoff nicht mehr Milchsäure schwindet. Die Dauer der Digestion ist nicht lange genug, um bei der nun einmal vorhandenen Atemgröße des Muskels einen größeren Effekt zu liefern. Die Digestion kann aber nicht länger ausgedehnt werden, da selbstverständlich die Überlebungsdauer der Muskulatur beschränkt ist und erfahrungsgemäß bei langer Digestion die Werte auch nicht höher werden, was vielleicht auf eine dann eintretende Schädigung des Fermentsystems zu beziehen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß sowohl beim anaeroben als beim aeroben Milchsäureabbau das Oxydoreduktionssystem Milchsäure-Brenztraubensäure im Mittelpunkt steht.

Der anaerobe Milchsäureabbau ist selbstverständlich wenn das System Milchsäure-Brenztraubensäure als reversibel erkannt ist. Ebenso wie bei der Glykolyse das Gleichgewicht durch die Vermehrung der Brenztraubensäure zur Milchsäure hin verschoben wird, entsteht bei Milchsäureüberschuß anaerob Brenztraubensäure bis wieder ein Gleichgewicht erreicht ist.

Man hat sich nun vorzustellen, daß in der Aerobiose die Umsetzung hier nicht stehen bleibt, sondern daß durch Abbau der Brenztraubensäure und deren Abbauprodukte durch Sauerstoff immer wieder von neuem Milchsäure schwinden kann. Auch der Milchsäureabbau mit Sauerstoff geht also zuerst anaerob zur Brenztraubensäure um dann erst in den folgenden Zwischenstufen der direkten Oxydation durch Sauerstoff zu unterliegen.

Da der anaerobe Milchsäureabbau nun aber auch von der Gegenwart anderer Acceptoren abhängig ist, hat er sein Ende erreicht, wenn die Summe aller Redoxpotentiale, von denen das System Milchsäure-Brenztraubensäure nur eines ist, Null ergibt. Durch Zutritt von Sauerstoff wird dieser Endzustand nicht erreicht, da ein Teil des Oxydoreduktionssystems zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wird. Wir haben also das Schema:

$$\text{Milchsäure} \rightleftharpoons \text{Brenztraubensäure} \begin{matrix} \leftarrow \text{Glykogen} \\ \rightarrow \text{Kohlensäure} + \text{Wasser} \end{matrix}$$

Zusammenfassung der eigenen Versuche:

1. Es ist möglich durch Hungernlassen von Ratten und zusätzlichem Phlorizindiabetes den Glykogenvorrat der Muskeln so herabzusetzen, daß die Glykolyse unterbleibt.

2. Bei solchen Muskeln wird ein oxydativer Milchsäureschwund bei Gegenwart von Sauerstoff beobachtet, bei dem der Abbau der Milchsäure bis zu Kohlensäure und Wasser führt.

Herrn Prof. Dr. H a h n bin ich für die Überlassung des Themas zu Dank verpflichtet. Ihm und Herrn Dr. N i e m e r danke ich auch für die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teiles.

Literatur.

1. Banga, Laki und Szent-Györgyi: H. S. 217, 43 (1933).
2. Dakin und Dudley: J. of biol. Chem. 15, 127 (1913).
3. Embden, Abraham und Lange: H. S. 136, 311 (1924).
4. Embden, Deuticke, Lehnartz u. Perger: H. S. 162, 167 (1927)
5. Embden Deuticke und Kraft: Klin. Wchsch. 12, 213 (1933).
6. Embden und Jost: H. S. 230, 69 (1934)
7. Embden: Handbuch d. Physiol. VIII, 1, S. 431 (1925).
8. Embden, Schmitz und Meinicke: H. S. 113, 60 (1921).
9. Fletcher und Hopkins: Journ. of Physiol. 35, 247 (1906-1907).
10. Fletcher und Hopkins: Pflüg. Arch. 188, 114 (1921).
11. Friedemann, Cottonio und Shaffer: J. of biol. Chem. 73, 334 und 359 (1927).
12. Grube: Pflüg. Arch. 121, 636 (1908); 126, 585 (1909); 139, 428 (1911)
13. Haarmann: Zit. nach Neuss: Arch f. exp. Path. und Pharm. 160, 555 (1931)
14. Hahn und Fischbach: Z. f. Biol. 89, 151 (1929).
15. Hahn, Fischbach und Haarmann: Z. f. Biol. 88, 520 (1929).
16. Hahn, Fischbach und Haarmann: Z. f. Biol. 88, 516 (1929).
17. Hahn, Fischbach und Haarmann: Z. f. Biol. 91, 58 (1930).
18. Hahn, Fischbach und Niemer: Z. f. Biol. 91, 57 (1931).
19. Hahn: Z. f. Biol. 91, 444 (1931).
20. Hahn, Belmonte und Niemer: Z. f Biol. 91, 491 (1931).
21. Hahn: Einführung in die physiol-chem. Arbeitsmethoden, Enke (1936) S. 26
22. Lichtwitz: Klinische Chemie, Springer (1930) S. 247.
23. Lipmann: Bioch. Z. 191, 442 (1927).
24. Lipmann: Bioch. Z. 196, 3 (1928).
25. Lipmann: Bioch. Z. 265, 133 (1933); 268, 205 (1934).
26. Lusk: Phlorizinglykosurie, Erg. d. Physiol. 12, 315 (1912).
27. Meyerhof: Pflüg. Arch. 175, 20 (1919).
28. Meyerhof: Erg. d. Physiol. 22, 334 (1923).
29. Meyerhof: Bioch. Z. 158, 320 (1925).
30. Neuberg und Langstein: Verh. phys. Ges. Berlin 16, 119 (1902/03).
31. Neuberg und Kobel: Bioch. Z. 207, 232 (1929).
32. Pasteur: Bulletin de la société chimique de Paris, 28. VI. 1861 S. 579—80.
33. Thunberg: Skand. Arch. 35, 163 (1917); 40, 1 (1920). Beschreibung auch bei Hahn (21) S. 65.
34. Utewsky: Bioch. Z. 215, 406 (1929).
35. Wieland: Über den Verlauf der Dehydrierungsvorgänge, Enke (1933).
36. Wurmser: zit. nach Lundsgaard. Ang. Chem. 47, 495 (1934).

Lebenslauf.

Am 6. März 1913 wurde ich als Sohn des Fabrikanten Fritz Bahner in Oberlungwitz geboren. Daselbst besuchte ich die Volksschule, später das Realgymnasium zu Chemnitz, wo ich am 1. März 1932 die Reifeprüfung bestand. Von da an studierte ich in München Medizin und legte im Juli 1934 das Physikum ab. Gleichzeitig betrieb ich das Studium der Chemie an der Universität München, worin ich das 1. chemische Verbandsexamen am 12. April 1935 bestand. Im November 1935 übersiedelte ich an die Medizinische Akademie in Düsseldorf, wo ich am 6. September 1937 das medizinische Staatsexamen ablegte.